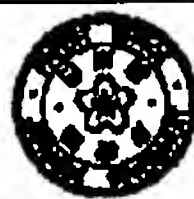


Best Available Copy

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11196870 A**

(43) Date of publication of application: 27 . 07 . 99

(51) Int. Cl. **C12N 15/09**
C12Q 1/00

(21) Application number: 10014840

(22) Date of filing: 08 . 01 . 98

(71) Applicant: **MIKOSHIBA**
KATSUHIKO HASHIMOTO
MITSUHIRO

(72) Inventor: **MIKOSHIBA KATSUHIKO**
HASHIMOTO MITSUHIRO

**(54) ANALYSIS OF FUNCTION OF RECEPTOR AND
SCREENING OF LIGAND MOLECULE**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To analyze the functions of all receptors and screen their ligands by using an adenovirus vector capable of transducing a gene into a non-dividing cell.

SOLUTION: A new adenovirus vector capable of allowing a gene to bicistronically or polycistronically

simultaneously express plural proteins is prepared using IRES(internal ribosome entry site). The transduction of the gene is carried out using the adenovirus vector in vivo. One of the plural protein is used as a receptor, and the other is used as a marker protein (green fluorescence protein, etc.). The expression of a gene transduced with the adenovirus vector is confirmed, and analyzed by an electrophysiological reaction.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-196870

(43)公開日 平成11年(1999) 7月27日

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A

C 1 2 Q 1/00

C 1 2 Q 1/00

Z

審査請求 未請求 請求項の数1 F D (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平10-14840

(71)出願人 392017978

御子柴 克彦

東京都三鷹市井の頭2-19-25

(22)出願日 平成10年(1998) 1月8日

(71)出願人 598012234

橋本 光広

茨城県つくば市高野台3-10-27-2-301

特許法第30条第1項適用申請有り 平成9年11月15日
発行の「第20回 日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集」に発表

(72)発明者 御子柴 克彦

東京都三鷹市井の頭2-19-25

(72)発明者 橋本 光広

茨城県つくば市高野台3-10-27-2-301

(74)代理人 弁理士 廣瀬 孝美

(54)【発明の名称】 受容体の機能解析法及びリガンド分子のスクリーニング法

(57)【要約】

【課題】 受容体の機能解析法及びリガンド分子のスクリーニング法を提供する。

【解決手段】 本発明は受容体の機能を解析する新しい方法及びリガンド分子のスクリーニング法に関する。に
おい受容体をはじめとして、フェロモン受容体とフェロ
モン分子の関係など、その他のあらゆる受容体の機能解
析とそのリガンド分子のスクリーニングに利用すること
ができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アデノウイルスベクターを用いた受容体の機能解析法及びリガンド分子のスクリーニング法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は受容体の機能解析法及びリガンド分子のスクリーニング法に関する。より詳細には、BicistronicあるいはPolycistronicに遺伝子を発現させる新規アデノウイルスベクター系を用いた受容体の機能解析法（例えば、にお受容体の機能解析法）及び用途に関する。

【0002】

【従来の技術】成熟した脳は数多くの神経系細胞で構成されている。神経細胞はそれぞれ異なる機能を持っているが、個々の神経細胞は単独で機能するわけではない。神経細胞は神経回路網（ニューロンネットワーク）という高次構造を形成し、お互いに情報を伝達することによって、記憶や学習など脳としての機能を発現する。脳の機能を分子レベルで解析するためには、神経回路網を形成している神経細胞へ効率よく遺伝子を導入する技術が必要となる。アデノウイルスベクターは神経細胞のような非分裂性細胞への遺伝子導入が可能であり、脳への遺伝子導入技術として有用性が高いことを示してきた（Human Gene Therapy, 7:149-158, 1997）。

【0003】ところで、にお受容体には、GTP結合タンパク質を介するcAMP依存的な情報伝達経路が関与することから、この経路におけるにお受容体は、7回膜貫通型のGTP結合タンパク質共役型受容体であると推測された。GTP結合タンパク質共役型受容体のアミノ酸残基保存性の高い部分に対応する縮重プライマーを用い、PCR法で嗅上皮に強く発現しているGTP結合タンパク質共役型受容体が多数クローニングされた。これらはGTP結合タンパク質共役型受容体スーパーファミリーの一部を形成し、すなわちにお受容体サブファミリーを形成しているとされた。このような経緯でにお受容体はクローニングされたために、にお受容体がどのようなにお物質を認識するのかなど、その機能については全く分かっていないのが現状である。

【0004】本発明者は、新規に作製したBicistronicあるいはPolycistronicアデノウイルスベクターを用いて1つのアデノウイルスベクターで2種類又はそれ以上のタンパク質を同時に発現させた。green fluorescence protein (GFP)をマーカー遺伝子として発現するBicistronicあるいはPolycistronicアデノウイルスベクターを用いることによって、アデノウイルスベクターによって遺伝子が導入された細胞を容易に同定することができた。しかも、組織を固定する必要がないので、電気生理解析、神経発生における神経細胞の移動の観察が容易にできた。当該アデノウイルスベクターを用いることによって、世界に先駆けてにお受容体の機能を電気生理的

に解析することに成功した。本発明はかかる知見に基づいてなされたもので、本発明は受容体の機能を解析する新しい方法及びリガンド分子のスクリーニング法を提供することを目的とする。にお受容体をはじめとして、フェロモン受容体とフェロモン分子の関係など、その他のあらゆる受容体の機能解析とそのリガンド分子のスクリーニングを提供する。

【0005】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するためになされた本発明は、アデノウイルスベクターを用いた受容体の機能解析法及びリガンド分子のスクリーニング法である。

【0006】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。体内に存在するある機能分子を発現するアデノウイルスベクターを作製し、そのアデノウイルスベクターを用いてin vivoへの遺伝子導入を行う場合、その機能分子の発現がアデノウイルスベクター由来なのか、本来生体内で発現しているものなのかを区別するためには、アデノウイルスのゲノムに対するin situ hybridizationを行うか、あるいはアデノウイルスベクターで発現させる機能分子にマーカー遺伝子(green fluorescence protein等)を融合したタンパク質(fusionprotein)を用いるしか方法は存在しない。in situ hybridizationを用いた場合、組織を4%パラホルムアルデヒドで固定しなければならないので電気生理的手法を用いて解析することは不可能である。fusion proteinを用いる場合、発現させる機能分子のC-末端側か、あるいはN-末端側にマーカー遺伝子を融合させるためマーカー遺伝子が機能分子の作用を阻害する可能性がある。特に、当該にお受容体の機能を解析するためには、電気生理的解析が不可欠であり、にお受容体の機能が未知であるため、fusion protein法を採用することはできない。そこで、IRES (internal ribosome entry site)を用いることによって、同時に複数のタンパク質を発現させることができるアデノウイルスベクター系を開発した。

【0007】にお受容体サブファミリーの1つであるI7にお受容体とgreen fluorescence protein (GFP)をそれぞれ過剰に発現させるアデノウイルスベクター(AdexCAG-I7-IRES-GFP、図1)を作製した。GFPは蛍光を発するタンパク質であり、その蛍光を観察することによってアデノウイルスベクターによって導入された遺伝子の発現を確認することができた。また、GFPの蛍光は組織を固定することなく観察できるので電気生理的手法を用いた解析が可能となった。

【0008】AdexCAG-I7-IRES-GFPをラットの嗅上皮に感染させ、1週間後にGFPで蛍光を発している部分に電極を置き、74種類のにお分子を供給し電気生理的反応を計測した(図2)。アデノウイルスベクター(AdexCAG-I7-IRES-GFP)を嗅上皮へ感染させたところ、嗅上皮上

の約30%の領域でGFPによる蛍光が観察できた。アデノウイルスベクターを感染させた嗅上皮から凍結切片を作製したところ、主に嗅神経にGFPが発現していることが確認された。また、アデノウイルスベクター感染後の嗅上皮からRNAを回収し、I7 におい受容体に対するプローブを用いて、ノーザン・ハイブリダイゼーションを行ったところ、I7 におい受容体のmRNAの発現量が有意に上昇していることが確認できた。

【0009】図2に示したような装置を使用し、におい分子に対する反応を電気生理的手法を用いて計測した。74種類のにおい分子に対する電気生理的反応を計測したところ、ある特定のにおい分子に対して特異的な電気生理的反応を示した。図3に74種類のにおい分子に対する電気生理的反応の中から、主だったもの9種類を示した。アデノウイルスベクター (AdexCAG-I7-IRES-GFP) による遺伝子導入前後で、オクタナール(オクチルアルデヒド)に対しての電気生理的反応が特異的に増加している。

【0010】図4では、アデノウイルスベクター (AdexCAG-I7-IRES-GFP) 感染前後の電気生理的反応性の比率を示した。オクタナール以外はアデノウイルスベクター感染前後で、1.7倍の差が生じた。白抜きの棒グラフはGFPを発現するアデノウイルスベクターを嗅上皮に感染させた場合の電気生理的反応性を示している。炭素数の異なるアルデヒドをにおい分子として与え、それぞれの電気生理的反応を計測した(図5)。アデノウイルスベクター (AdexCAG-I7-IRES-GFP) を感染させた嗅上皮は、側鎖の炭素数が8個のアルデヒド (オクタナール) をにおい分子として用いたときに、最も高い電気生理的反応を示した。

【0011】本発明者は、アデノウイルスベクター (AdexCAG-I7-IRES-GFP) を用いて嗅神経に遺伝子を導入し、I7 におい受容体とgreen fluorescence protein (GFP) をそれぞれ単独に発現させることに成功した。嗅上皮にGFPを過剰に発現させただけではにおい分子に対して電気生理的反応は変化は見られなかった(図4)。ゆえに、アルデヒドに対する電気生理的反応は、I7 におい受容体の機能による反応であることを明らかにした。また、I7 におい受容体は、におい分子のアルデヒド基のみを認識しているのではなく、直鎖上の炭素数をも含めたにおい分子の構造を認識して、電気生理的反応を呈示することを明らかにした。つまり、これらの結果は、従来、アフリカツメガエルの卵母細胞あるいは線維芽細胞では実現できなかった新たな知見である。

【0012】本発明に係る技術は、におい受容体とにおい分子に限らず、あらゆる受容体とそのリガンド分子の機能解析及び受容体を利用したリガンド分子のスクリーニングに応用される。

【0013】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明をより詳細に

説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

実施例1

組換えアデノウイルスベクターの構築

作製した組換えアデノウイルスは、アデノウイルスのE1AならびにE1Bを除き、非複製型ウイルスベクターとなるように設計した。ゆえに、組換えアデノウイルスは細胞に感染して遺伝子の導入を行うが、細胞内で増殖することとはなかった。CAGプロモターによってmRNAはOR-I7-IRES-GFP(図1)とひとつづきになって転写されるが、IRESの立体構造(ヘアピンループ)を認識してribosomeがIRESに結合し、IRESより下流の遺伝子をタンパク質へと翻訳した。よって、OR-I7とGFPはそれぞれ単独で翻訳されることが判明した。なお、図中の略号は以下のとおりである。

CAG: 非常に強力な転写活性を有するプロモーター

OR-I7: I7 odorant receptor

IRES: internal ribosome entry site

GFP: green fluorescence protein

GpA: poly A additional signal

【0014】実施例2

におい分子に対する反応を電気生理的に計測する方法の確立及びその結果

精製組換えアデノウイルスAdexCAG-I7-IRES-GFPを含む緩衝液30 μ l(力価は3 $\times 10^9$ pfu/ml)を麻醉下でラットの鼻腔に接種した。ラットは3-8日後に屠殺し、鼻腔を開口した。蛍光照射によってGFPは容易に観察でき、ウイルス感染とタンパク質の発現のパターンは確認できた。感覚神経の1-2%が感染していてGFP gene productが発現していた。I7 におい受容体とGFPのbicistronic mRNAの発現は感染上皮のノーザンブロットで確認された。I7 遺伝子の全配列のプローブを使用することによって感染上皮には3kbの単一バンドが確認されたが、非感染上皮では認められなかった。このことから感染上皮ではI7 におい受容体が発現していることが容易に想像できる。におい分子をそれぞれ 10^{-2} から 10^{-3} Mの濃度で調製して実験に供した。におい分子の供給とEOG(Electro-olfactogram)記録法は図2に示した。におい分子を湿潤空気(humidified air)に注入して感覚上皮に与えた。当該条件下ではその組織は3時間まで生存し、30-50個のにおい分子に対する反応を測定することが可能であった。

【0015】74種類のにおい分子に対する電気生理的反応の中から、主だった9種類を示した(図3)。最上段がアデノウイルスベクター (AdexCAG-I7-IRES-GFP) を感染させていない状態でのにおい分子に対する電気生理的反応を示し、中段がアデノウイルスベクター (AdexCAG-I7-IRES-GFP) を感染させた後のにおい分子に対する電気生理的反応で、最下段が最上段と中段の差し引きを意味する。アデノウイルスベクター (AdexCAG-I7-IRES-GF

P)による遺伝子導入前後で、オクタナールに対しての電気生理的反応が特異的に増加している。

【0016】実施例3

におい分子に対する電気生理的反応の解析

アデノウイルスベクター(AdexCAG-I7-IRES-GFP)を感染させていない状態での電気生理的反応性を1.0とした場合(非感染)と、感染後の電気生理的反応性(I7感染)の比を棒グラフで示した(図4)。オクタナール以外は非感染とI7感染で有意な差がないのに対して、オクタナールではアデノウイルスベクター感染前後で、1.7倍の差が生じた。図4のAdexGFP infectedの棒グラフは、GFPを発現するアデノウイルスベクターを嗅上皮に感染させた場合の電気生理的反応を示している。嗅上皮にGFPを過剰に発現させただけでは、におい分子に対する電気生理的反応性は変化しなかった。

【0017】実施例4

におい分子の炭素数と電気生理的反応の解析

I7におい受容体がにおい分子のどの構造を認識して電気生理的反応を示すのかを解析するために、直鎖状の炭素数の異なるアルデヒドをにおい分子として与え、それぞれの電気生理的反応を計測した(図5)。I7におい

受容体はにおい分子のアルデヒド基のみを認識しているだけでなく、直鎖状の炭素数も含めたにおい分子の構造を認識して反応を示していることが判明した。

【0018】

【発明の効果】以上のように、本発明においては、組織に複数の蛋白質を発現することができるアデノウイルスベクターが使用されており、組織に簡便且つ確実に受容体などを導入することができる。従って、本発明によれば、種々の受容体の機能解析及びそのリガンド分子のスクリーニングを行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】アデノウイルスベクター(AdexCAG-I7-IRES-GFP)の構造を示す図である。

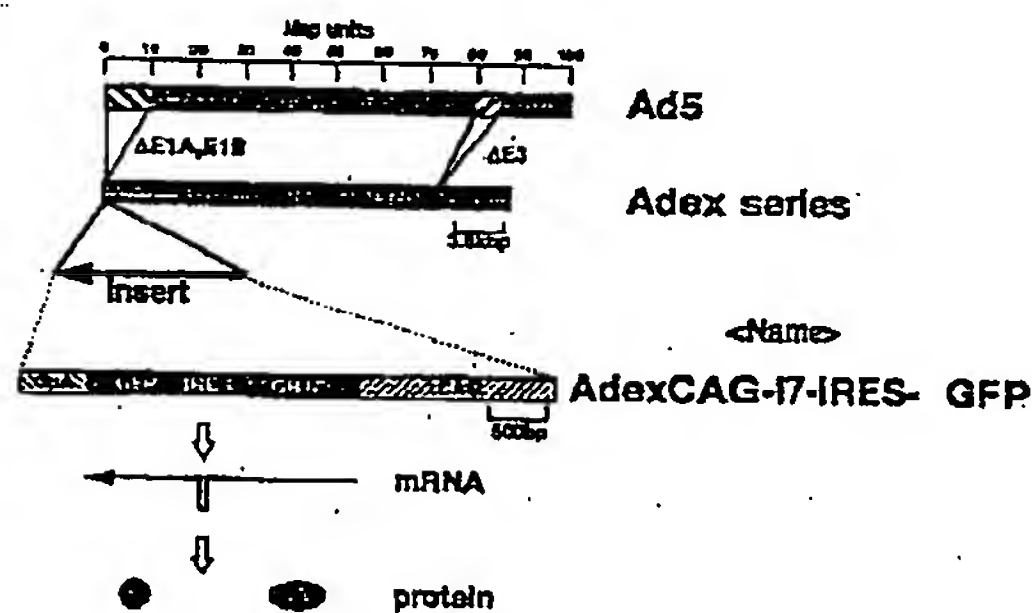
【図2】におい分子に対する反応を電気生理的に計測する方法を示す図である。

【図3】におい分子に対する反応を電気生理的に計測した結果を示す図である。

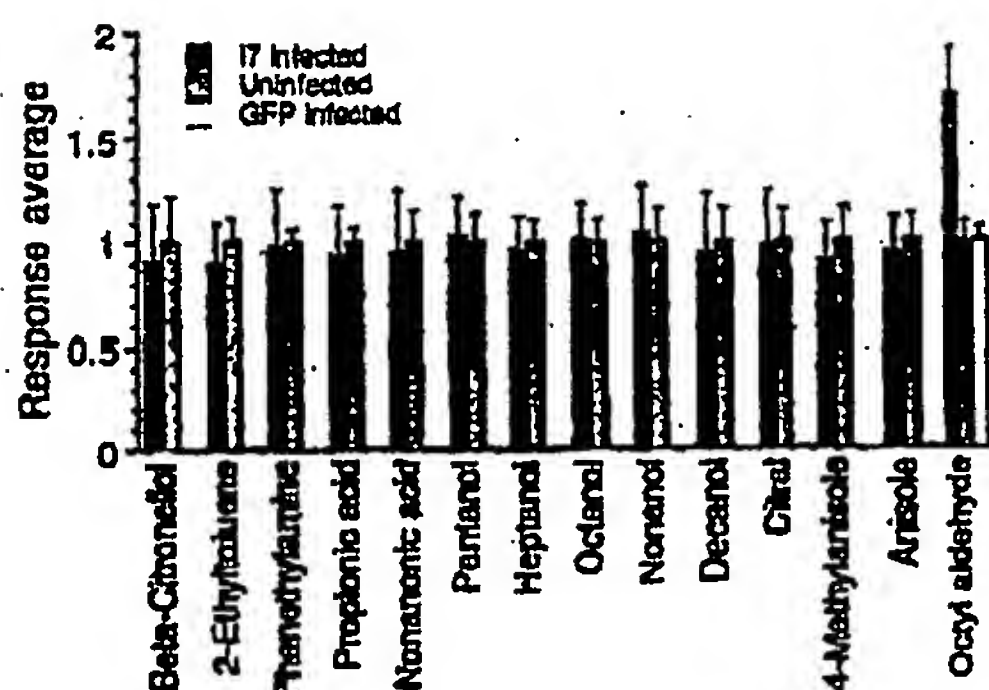
【図4】におい分子に対する電気生理的反応性の比率を示す図である。

【図5】におい分子の炭素数と電気生理的反応の関係をj示す図である。

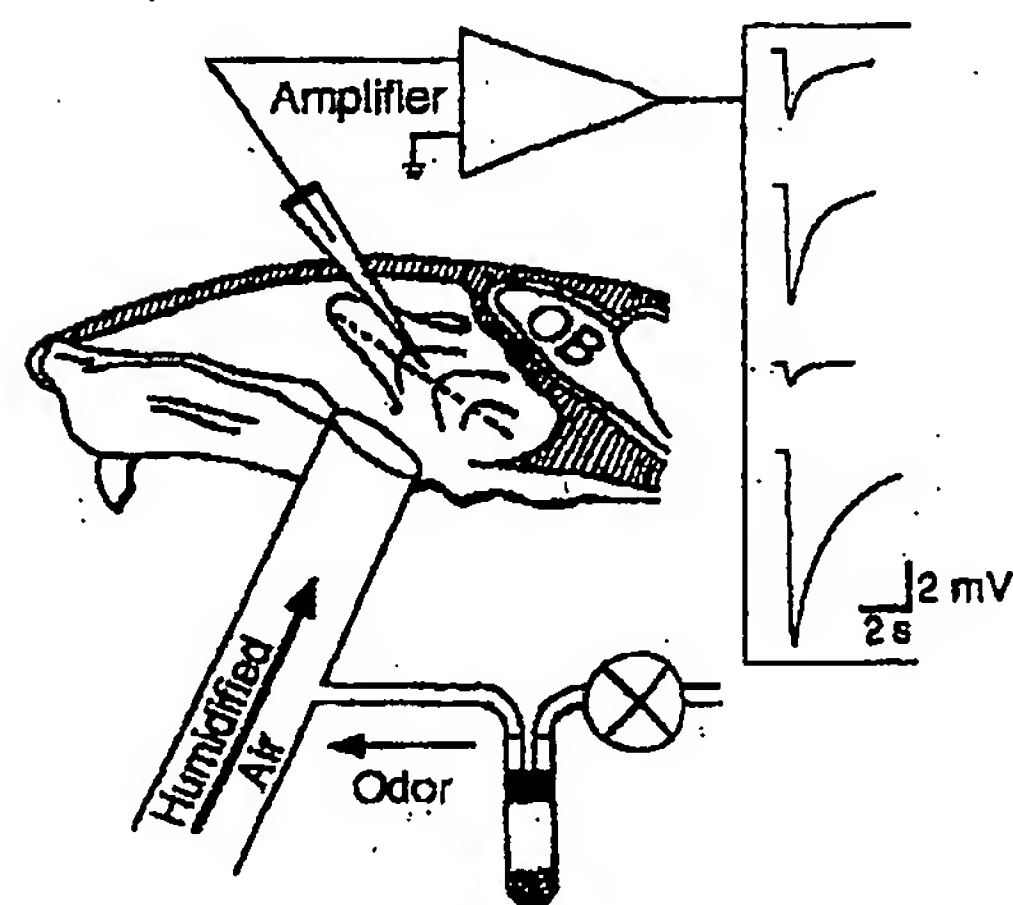
【図1】



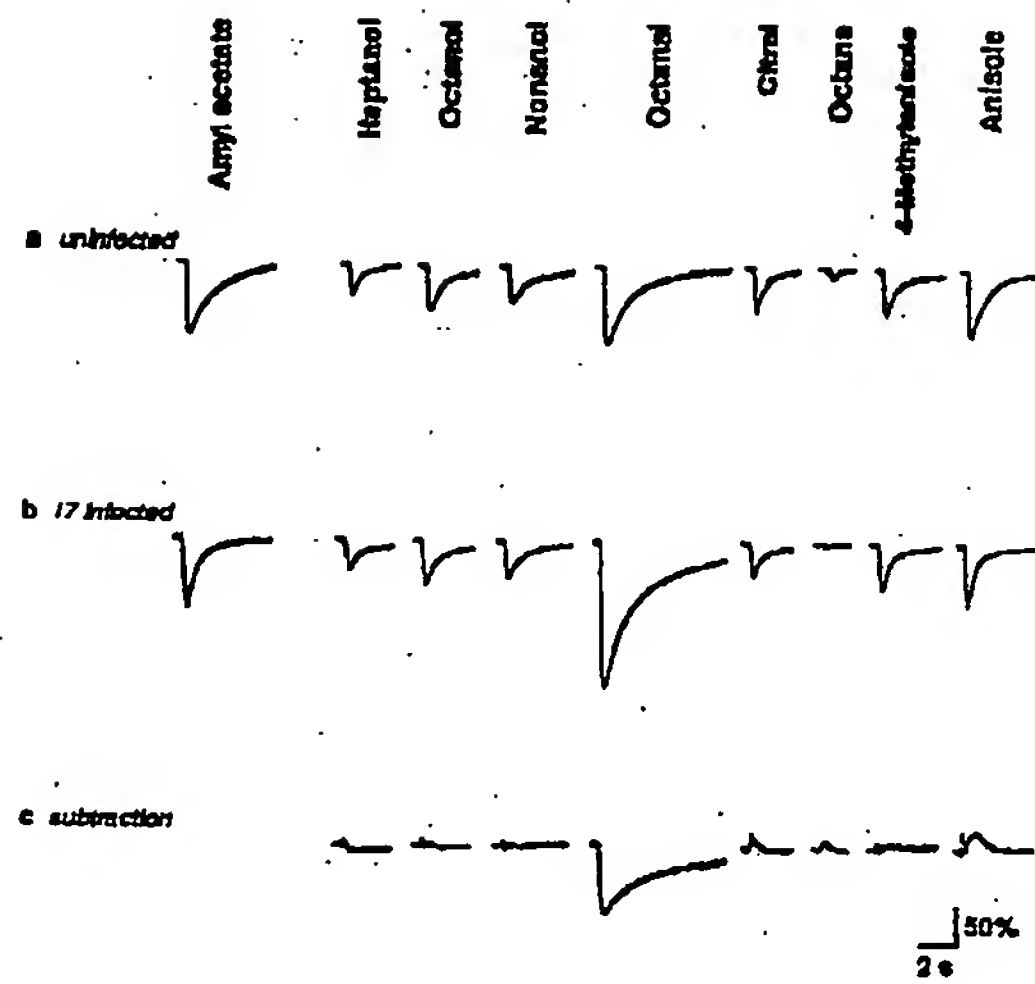
【図4】



【図2】



【図3】



【図5】

